



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**“Análisis funcional de la protocadherina
PCDHGC3 en el fenotipo metastásico de
paragangliomas y feocromocitomas”**

Lucía Celada Crespo

Trabajo Fin de Máster

Oviedo, Julio 2018

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaturas	2
1. Introducción	4
1.1. Paragangliomas y feocromocitomas	5
1.1.1. Definición, clasificación y características generales	5
1.1.2. PPGLs metastásicos	6
1.1.3. Patogénesis molecular	7
1.1.3.1. PPGLs con mutaciones en los genes <i>SDH</i> (<i>SDHx</i> -PPGL)	9
1.1.3.1.1. <i>SDHB</i> , metástasis y metilación del ADN	11
2. Hipótesis y objetivos	13
3. Materiales y métodos	15
3.1. Líneas celulares y condiciones del cultivo	16
3.2. Silenciamiento génico mediado por ARNsh	17
3.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real	18
3.3.1. Extracción de ARN	19
3.3.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc)	19
3.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	20
3.4. Caracterización funcional de las líneas celulares generadas	21
3.4.1. Ensayo de proliferación celular por conteo	21
3.4.2. Ensayo de crecimiento celular clonogénico	21
3.4.3. Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo	21
3.4.4. Microscopía Time-lapse	22
3.4.4.1. Ensayo de migración celular a tiempo real	22
3.4.4.2. Ensayo de invasión celular colectiva	23
3.5. Análisis estadístico	25
4. Resultados y discusión	26
4.1. Silenciamiento génico de <i>PCDHGC3</i> en modelos celulares	27
4.2. Eficiencia del silenciamiento génico de <i>PCDHGC3</i>	28
4.3. Caracterización funcional de las líneas celulares tras el silenciamiento de <i>PCDHGC3</i>	28
4.3.1. El silenciamiento de <i>PCDHGC3</i> incrementa la proliferación celular <i>in vitro</i>	28
4.3.2. El silenciamiento de <i>PCDHGC3</i> induce la capacidad celular clonogénica	30
4.3.3. Alteración del ciclo celular tras el silenciamiento de <i>PCDHGC3</i>	31
4.3.4. Incremento de la migración celular tras el silenciamiento de <i>PCDHGC3</i>	32
4.3.5. Incremento de la invasión celular tras el silenciamiento de <i>PCDHGC3</i>	32
5. Conclusiones	36
Agradecimientos	38
Bibliografía	39

RESUMEN

Los paragangliomas (PGLs) y feocromocitomas (PCCs), colectivamente PPGLs, son tumores raros derivados de células neuroendocrinas. La mayoría tienen un comportamiento clínico benigno, pero hasta un 25% son tumores malignos causantes de metástasis a distancia. Hoy en día, los marcadores de la enfermedad metastásica son limitados, por lo que existe una necesidad creciente de encontrar nuevos biomarcadores pronósticos capaces de identificar pacientes con un alto riesgo de metástasis.

Muchos pacientes con PPGLs tienen mutaciones en la línea germinal en genes bien caracterizados, como aquellos que codifican para el complejo de la succinato deshidrogenasa (SDH). Mutaciones en el gen *SDHB* se han asociado a PPGLs metastásicos, pero los mecanismos patogénicos aún no se han definido.

Estudios previos han demostrado la existencia de hipermetilación global del ADN en PPGLs de pacientes con mutaciones en los genes *SDH* y han postulado la participación crítica de los genes silenciados epigenéticamente en el desarrollo de estos tumores. No obstante, hasta el momento, ninguno de los eventos epigenéticos se ha podido relacionar con el comportamiento metastásico de los PPGLs con mutaciones en *SDHB* (*SDHB*-PPGLs).

El trabajo desarrollado recientemente en este grupo de investigación puso de manifiesto que el agrupamiento génico de protocadherinas, *PCDHGC*, se encontraba metilado en *SDHB*-PPGLs primarios con comportamiento metastásico y esto se correlacionaba significativamente con una disminución del ARNm de *PCDHGC3* y un descenso en la supervivencia de los pacientes. Por este motivo, el presente trabajo se dirigió al análisis de la importancia funcional de la pérdida de *PCDHGC3* en células cancerosas. Los resultados obtenidos sugieren que *PCDHGC3* puede actuar como supresor tumoral y que el silenciamiento epigenético del gen es crítico para la tumorogenicidad de los *SDHB*-PPGLs.

En conclusión, la metilación de *PCDHGC3* se propone potencialmente como un biomarcador pronóstico para el desarrollo de metástasis en pacientes con *SDHB*-PPGLs.